昆虫学报 Acta Entomologica Sinica，December 2003，46（6）：761－765 ISSN 0454-6296

运用RAPD技术对棺头蟋属昆虫亲缘关系的研究
（直翅目：蟋蟀总科，蟋蟀科）

李 恺[1]，郑哲民[2]，陈立侨[1]
（1.华东师范大学生命科学学院，上海 200062；2.陕西师范大学动物研究所，西安 710062）

摘要：用RAPD技术研究了棺头蟋属 *Loxoblemmus* 9个种的亲缘关系。研究中每种使用了3个标本，试验所用的54种随机引物中，有9种引物能扩增出清晰而稳定的多态性片断，多态性片断共计193条。根据扩增结果，计算了个体间及种间扩增片断共享度和遗传距离，用UPGMA法进行聚类分析，构建系统树。每个种均各自聚为一类，聚类结果所呈现的属内种间关系与传统分类研究基本一致。

关键词：直翅目；蟋蟀总科；棺头蟋属；亲缘关系；RAPD
中图分类号：Q969.26 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2003）06-0761-05

Analysis of relationships among species in the genus *Loxoblemmus*（Orthoptera：Grylloidea，Gryllidae）using random amplified polymorphic DNA（RAPD）

LI Kai[1]，ZHENG Zhe-Min[2]，CHEN Li-Qiao[1]（1. School of Life Sciences，East China Normal University，Shanghai 200062；2. Institute of Zoology，Shaanxi Normal University，Xi'an 710062，China）

Abstract：The technique of random amplified polymorphic DNA（RAPD）was used to study the relationships of 9 species in the genus *Loxoblemmus*. A total of 27 samples were used in this study：3 samples for each species. Among 54 arbitrary primers（10 bp）under predetermined optimal reaction conditions，9 primers were informative and yielded a total of 193 clear and reproducible bands. Dendrograms were constructed based on genetic distance by the UPGMA method. Individuals of the same species clustered together. The relationships indicated by cluster analysis was mostly the same as those based on comparative morphology.

Key words：Orthoptera；Grylloidea；*Loxoblemmus*；relationship；RAPD

棺头蟋属 *Loxoblemmus* 是 Saussure 于1877年建立的，本属是蟋蟀总科 Grylloidea 中的广布类群，种类较多，现在全世界已知41种，我国已知15种（殷海生和刘宪伟，1995）。由于本属形态上难以区分的近缘种较多，一些种类之间存在着过渡类型，给本属的种类鉴定造成了一定困难，如台湾棺头蟋 *L. formosanus* 和小棺头蟋 *L. aomoriensis* 的外部形态及外生殖器的差异不太明显，在形态上较难区分；本属也存在同物异名现象及有争议的种类，如窃棺头蟋 *L. detectus* 和哈尼棺头蟋 *L. hanni* 的分合问题（殷海生和刘宪伟，1995；Otte，1996；尤平和郑哲民，2001）。另外，本属的雌性难以鉴别区分，这也一直是困扰形态分类学家的问题。目前关于本属的系统学研究主要以形态学性状为依据（Chopard，1969；Gorochov，1985；殷海生和刘宪伟，1995），而对本属种类亲缘关系研究仅见尤平和郑哲民（2001）对五种棺头蟋核型的比较研究。

RAPD技术是 Williams 和 Welsh 等分别于1990年报道的一项DNA多态性检测技术（Williams *et al.*，1990；Wellsh and McClelland，1990），由于其具有简便、快捷等特点，被广泛应用于种属分类鉴定、基因图谱构建以及物种亲缘关系和系统进化等的研究（鲁亮和归鸿，1995；Chu and Howard，1998；沈曦等，1999；田英芳等，2001；田英芳和郑哲民，2001，2002；朱道弘等，2001；蒋国芳等，2002；鲁成等，2002；张素芳等，2002）。本文运用RAPD技术对我国棺头蟋属常见种类的基因组DNA多态性进行了分析，在分子水平探讨它们的分类地

基金项目：国家自然科学基金重点资助项目（30130040）；国家自然科学基金资助项目（3957010）
作者简介：李恺，女，1971年生，陕西人，博士，讲师，从事昆虫系统学研究，E-mail：kaili@bio.ecnu.edu.cn
收稿日期 Received：2002-12-23；接受日期 Accepted：2003-04-28

位和亲缘关系，旨在为补充和完善棺头蟋属的分类及蟋蟀科的分类系统提供分子水平的证据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究所用实验材料均为100%酒精浸泡标本，首先依据形态特征对标本进行鉴定（Chopard，1969；Gorochov，1985；殷海生和刘宪伟，1995），种类、数量及采集地点和时间详见表1。

表1 实验材料种类和产地

Table 1 List of species and locality of samples

样品号 Sample code	种名 Species	数量 Number	采集时间 Collection date	采集地点 Collection site
A1-3	尖角棺头蟋 *L. angulatus* B.-Bienko	3♂	2000.08.03	广西陇瑞 Longrui，Guangxi
B1-3	多伊棺头蟋 *L. doenitzi* Stein	3♂	2001.08.26	陕西西安Xi'an，Shaanxi
C1-3	窃棺头蟋 *L. detectus* (Serville)	3♂	1999.08.22	四川旺苍 Wangcang，Sichuan
D1-3	石首棺头蟋 *L. equestris* Saussure	3♂	2000.08.03	广西陇瑞 Longrui，Guangxi
E1-3	雅棺头蟋 *L. jacobsoni* Chopard	3♂	2000.08.16	广西莲花山 Lianghua Shan，Guangxi
F1-3	泰康棺头蟋 *L. taicoun* Saussure	3♂	2000.08.11	广西岑王老山 Cenwanglao Shan，Guangxi
G1-3	台湾棺头蟋 *L. formosanus* Shiraki	3♂	1999.08.29	甘肃文县碧口镇 Bikou，Wenxian，Gansu
H1-3	介棺头蟋 *L. intermedius* Chopard	3♂	2000.08.10	广西老山林场 Lao Shan，Guangxi
I1-3	小棺头蟋 *L. aomoriensis* Shiraki	3♂	1999.08.28	甘肃文县碧口镇 Bikou，Wenxian，Gansu

1.2 基因组DNA的提取及检测

参照田英芳等（1999）昆虫基因组DNA提取方法并作了部分修改。取每个蟋蟀的一只后足股节的肌肉组织匀浆提取基因组DNA，其余部分保留。

凝胶电泳（1%琼脂糖）检测DNA样品的有和无，并用美国Beckman公司DUR640核酸/蛋白质分析仪对样品进行了纯度和浓度的检测。

1.3 RAPD-PCR扩增及电泳

根据预实验中对PCR各组分的优化结果，扩增反应体系的组分如下：反应总体积为25 μL，含2.5 μL PCR 10 × buffer，2.0 mmol/L $MgCl_2$，4种dNTP各0.1mmol/L，20 ng引物，2.5U TaqDNA聚合酶（上海Sangon公司）及25～50 ng模板DNA。

反应程序为：94℃预变性1 min 45 s，94℃变性30 s，37℃退火1 min，72℃延伸2 min，共45个循环，最后一个循环后在72℃延伸10 min。

PCR扩增仪使用美国Thermdyne Amlitron Ⅱ型，所用随机引物为上海Sangon生物工程公司合成。

扩增产物用含有0.05%溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，电泳缓冲液为0.5 × TBE，输出电压50 V，电泳约2 h，紫外透射仪上观察并拍照。

1.4 RAPD结果分析

根据记录实验结果的照片计数清晰可辨稳定的扩增片断，用数字“1”，“0”表示扩增片断的有或无，同时根据Nei等（1979）的公式：$F = 2N_{XY}/(N_X + N_Y)$（其中N_{XY}为X，Y两个样品共同拥有的扩增带，N_X和N_Y分别为X和Y两个样品的扩增带），计算样品之间的随机扩增多态性DNA片断共享度F（又称遗传相似系数）和遗传距离D，用PHYLIP（Version 3.5C）软件包进行数据处理，采用两类数据模式：一类以个体为单位，另一类以种为单位。以PHYLIP中的Neighbor进行UPGMA聚类分析，得到聚类图，再用Bootstrap对聚类图进行可信度分析。

2 结果

2.1 引物筛选及RAPD扩增结果

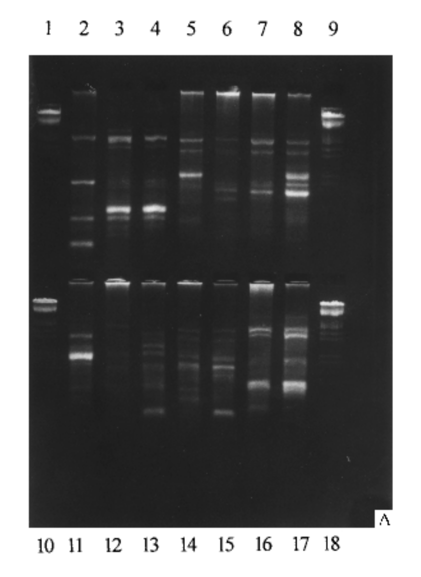
研究中共使用54种随机引物，经筛选有9种引物S8、S83、S142、S4、S50、S61、S97、S55、S379可产生稳定的扩增带，其碱基序列及扩增带数见表2。

表 2　随机引物序列及扩增带数

Table 2　List of sequence of primers and numbers of RAPD bands

引物 Primer	引物序列（5′→3′） Sequence	扩增带数 Numbers of RAPD bands	引物 Primer	引物序列（5′→3′） Sequence	扩增带数 Numbers of RAPD bands
S4	GGACTGGAGT	23	S83	GAGCCCTCCA	15
S8	GTCCACACGG	15	S97	ACGACCGACA	24
S50	GGTCTACACC	22	S142	GGTGCGGGAA	19
S55	CATCCGTGCT	27	S379	CACAGGCGGA	26
S61	TTCGAGCCAG	22	合计 Total		193

从表 2 可见，9 种随机引物总扩增带数为 193，平均每种引物扩增带数为 21.4 条。扩增带数最多的为 S55，为 27 条；扩增带数最少的为 S8 与 S83，均为 15 条。不同引物扩增产物有显著差异。引物 S50 对 9 种棺头蟋 27 个个体的扩增图谱如图 1 所示。



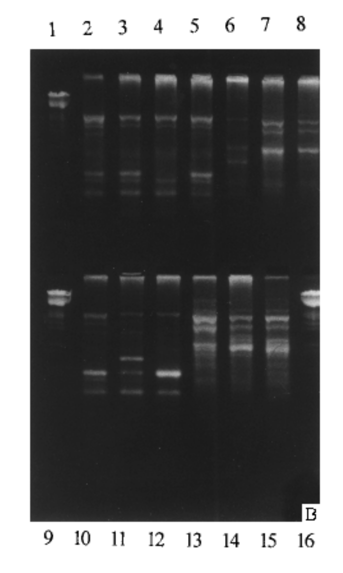


图 1　引物 S50 对棺头蟋属 9 种蟋蟀的 RAPD 扩增结果

Fig. 1　Amplification of generic DNA of 9 species in the genus *Loxoblemmus* using primer S50

A: 1, 9, 10, 18. 分子量标记（λDNA/*Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ）; 2～4. 尖角棺头蟋 *L. angulatus*; 5～7. 多伊棺头蟋 *L. doenitzi*; 8, 11, 12. 窃棺头蟋 *L. detectus*; 13～15. 石首棺头蟋 *L. equestris*; 16～17. 雅棺头蟋 *L. jacobsoni*.

B: 1, 9, 16. 分子量标记（λDNA/*Eco*RⅠ + *Hind*Ⅲ）; 2. 雅棺头蟋 *L. jacobsoni*; 3～5. 泰康棺头蟋 *L. taicoun*; 6～8. 台湾棺头蟋 *L. formosanus*; 10～12. 介棺头蟋 *L. intermedius*; 13～15. 小棺头蟋 *L. aomoriensis*.

2.2　遗传距离、遗传一致性和聚类图

同前面的方法，得到 9 种棺头蟋 27 个个体间及种间的扩增片断共享度（F）和遗传距离（D），种间扩增片断共享度和遗传距离见表 3。根据遗传距离用 UPGMA 法聚类分析得聚类图（图 2，图 3）。Bootstrap 分析其聚类图的可信度均在 51%以上。

表 3　棺头蟋属 9 个种的 PAPD 片断共享度（上三角）和遗传距离（下三角）

Table 3　The proportion of RAPD fragments shared（*F*）（upper diagonal）and the genetic distance（lower diagonal）among 9 species of *Loxoblemmus*

种名 Species	A	B	C	D	E	F	G	H	I
尖角棺头蟋 *L. angulatus*		0.6581	0.5565	0.6613	0.7290	0.6317	0.6410	0.7366	0.6133
多伊棺头蟋 *L. doenitzi*	0.3419		0.8293	0.6162	0.5685	0.4902	0.7990	0.6033	0.6307
窃棺头蟋 *L. detectus*	0.4435	0.1707		0.5360	0.5267	0.4438	0.7409	0.5771	0.6599
石首棺头蟋 *L. equestris*	0.3387	0.3838	0.4640		0.6506	0.5164	0.4597	0.6277	0.5009
雅棺头蟋 *L. jacobsoni*	0.2710	0.4315	0.4733	0.3494		0.7129	0.5700	0.7889	0.5096
泰康棺头蟋 *L. taicoun*	0.3683	0.5098	0.5562	0.4836	0.2871		0.4453	0.8104	0.3569
台湾棺头 *L. formosanus*	0.3590	0.2010	0.2591	0.5403	0.4300	0.5547		0.5213	0.7966
介棺头蟋 *L. intermedius*	0.2634	0.3967	0.4229	0.3723	0.2111	0.1896	0.4787		0.4714
小棺头蟋 *L. aomoriensis*	0.3867	0.3693	0.3401	0.4991	0.4904	0.6431	0.2034	0.5286	

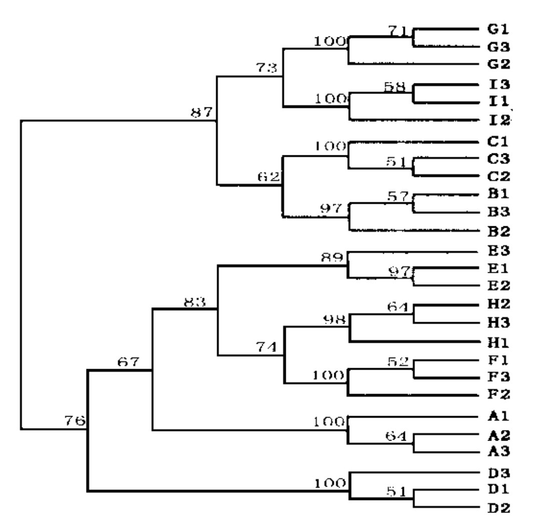


图2 根据遗传距离用UPGMA法得到27个蟋蟀样品的聚类

Fig. 2 Dendrogram of 27 samples of cricket DNA based on genetic distance using UPGMA

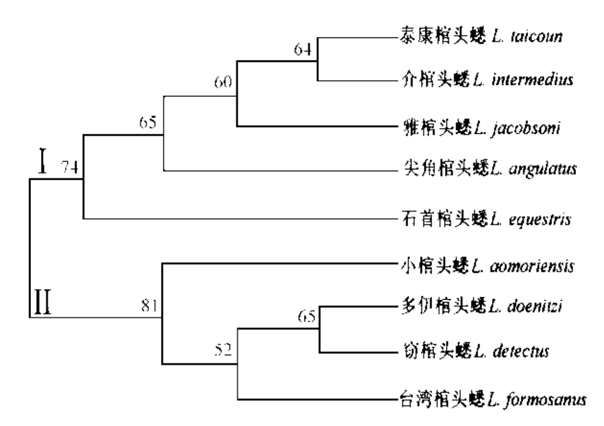


图3 根据遗传距离用UPGMA法得到的9种蟋蟀的聚类图

Fig. 3 Dendrogram of 9 species of crickets based on genetic distance using UPGMA

3 讨论

棺头蟋是常见的一类蟋蟀，主要通过雄性颜面和外生殖器特征进行识别，由于本属形态上难以区分的近缘种较多，有的种类间存在着过渡类型，给本属的种类鉴定造成了一定困难。我们研究了我国常见的9种棺头蟋以探讨RAPD技术在该属种类鉴定、亲缘关系分析等研究中的适用性。从图2~3的结果来看，以个体为单位的聚类图显示（图2），每一种的不同个体均聚在一起，这说明同种不同个体之间虽然存在差异，但个体差异小于种间差异，同时也表明实验中建立的RAPD反应体系较为稳定，可用于分类和进化的研究。9种棺头蟋的种间聚类图（图3）所显示的两大分支正是代表了棺头蟋属的两大类：第Ⅰ大类的触角第一节具突起，第Ⅱ大类的触角第一节缺突起。在第Ⅰ大类中：触角第一节突起较长的4种棺头蟋有着较近的亲缘关系，在这4种中泰康棺头蟋与介棺头蟋最近（遗传距离为0.1896），在形态上它们也较相似，雅棺头蟋次之，尖角棺头蟋与它们亲缘关系较远，在形态上也仅尖角棺头蟋的额突端缘呈角状突出；而触角第一节突起很短的石首棺头蟋与前几种亲缘关系最远。在第Ⅱ大类中：颊面具侧突的窃棺头蟋与多伊棺头蟋亲缘关系最近（遗传距离为0.1707），首先聚在一起，接着颊面缺侧突的台湾棺头蟋与小棺头蟋依次与它们相聚，形态上相近的台湾棺头蟋与小棺头蟋也有着较近的亲缘关系（遗传距离为0.2034），但它们被很好的区分开了。从聚类图的分支关系看，这9种棺头蟋大致存在两个相对独立的聚类，属内种间亲缘关系的远近程度可以清楚地显示。这些与传统形态分类基本吻合，也与尤平和郑哲民（2001）对5种棺头蟋核型的比较研究得出的该5种棺头蟋的亲缘关系相似。

在实验中经过比较发现，尽管影响RAPD的因素较多，但只要注意反应条件的优化，试验条件的稳定，其结果具有重复性。同时，本研究显示RAPD技术在属内种间的系统学研究中具有很好的适用性，也可以准确而快速地解决棺头蟋属近缘种、疑难种的问题。

参 考 文 献 (References)

Chopard L, 1969. The Fauna of India and the Adjacent Countries, Orthoptera, Vol. 2. Grylloidea. Zoological Survey of India. 121-133.

Chu J, Howard D J, 1998. Genetic linking maps of the ground crickets *Allonemobius fasciatus* and *Allonemobius socius* using RAPD and allozyme markers. *Genome*, 41 (6): 841-847.

Gorochov A V, 1985. On the fauna of Grylloidea (Orthoptera) of China. *Entomol. Obozr.*, 64 (4): 89-109.

Jiang G F, Lu G, Huang K, Huang R B, 2002. Studies on genetic variations and phylogenetic relationships among five species of *Tetrix* using RAPD markers. *Acta Entomol. Sin.*, 45 (4): 499-502. [蒋国芳，陆敢，黄琨，黄日波，2002. 用RAPD标记研究蚱属五个种间的亲缘关系. 昆虫学报，45 (4): 499-502]

Lu C, Yu H S, Xiang Z H, 2002. The genetic diversity and phylogenetic relationship of *Bombyx mandarina* and *B. mori* from China based on

RAPD analysis. *Acta Entomol. Sin.*, 45 (2): 198 - 203. [鲁成，余红仕，向仲怀，2002. 基于 RAPD 分析的中国野桑蚕和家蚕遗产多样性和系统发育关系研究. 昆虫学报，45 (2): 198 - 203]

Lu L, Gui H, 1995. The peculiarity of RAPD and its application on insect taxonomy. *Acta Entomol. Sin.*, 38 (1): 117 - 122. [鲁亮，归鸿，1995. RAPD 的技术特点及在昆虫分类中的应用. 昆虫学报，38 (1): 117 - 122]

Otte D, 1996. Orthoptera Species File. 1. Crickets (Grylloidea). Philadelphia: The Orthopterists' Society and the Academy of Natural Sciences of Philadelphia. 12 - 13.

Shen X, Zhou K Y, Wang Y Q, 1999. RAPD analysis of pit-vipers of the genus *Agkistrodon* in China. *Acta Zoologica Sinica*, 45 (1): 40 - 48. [沈曦，周开亚，王义权，1999. 中国蝮属蛇类的 RAPD 分析. 动物学报，45 (1): 40 - 48]

Tian Y F, Huang G, Zheng Z M, Wei Z M, 1999. A simple method for isolation of insect total DNA. *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 27 (4): 82 - 84. [田英芳，黄刚，郑哲民，魏朝明，1999. 一种简易的昆虫基因组 DNA 提取方法. 陕西师范大学学报（自然科学版），27 (4): 82 - 84]

Tian Y F, Zheng Z M, 2001. RAPD Study of seven species of crickets (Orthoptera: Grylloidea) from China. *Entomotaxonomia*. 23 (4): 248 - 252. [田英芳，郑哲民，2001. 七种蟋蟀基因组 DNA 的 RAPD 多态性研究（直翅目：蟋蟀总科）. 昆虫分类学报，23 (4): 248 - 252]

Tian Y F, Zheng Z M, 2002. Random amplified polymorphic DNA in five species of crickets (Ortoptera: Grylloidea). *Journal of Shaanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 30 (2): 91 - 93. [田英芳，郑哲民，2002. 五种蟋蟀的 RAPD 研究初报（直翅目：蟋蟀总科）. 陕西师范大学学报（自然科学版），30 (2): 91 - 93]

Wellsh J, McClelland M, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 7 213 - 7 218.

Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6 531 - 6 535.

Yin H S, Liu X W, 1995. Synopsis on the Classification of Grylloidea and Gryllotalpoidea from China. Shanghai: Shanghai Scientific and Technological Literature Publishing House. 67 - 72. [殷海生，刘宪伟，1995. 中国蟋蟀总科和蝼蛄总科分类概要. 上海：上海科学技术文献出版社. 67 - 72]

You P, Zheng Z M, 2001. Comparative study of karyotypes in five *Loxoblemmus* species. *Acta Entomol. Sin.*, 44 (1): 40 - 45. [尤平，郑哲民，2001. 五种棺头蟋核型的比较研究. 昆虫学报，44 (1): 40 - 45]

Zhang S F, Cheng J A, Yang X W, 2002. RAPD analysis of different forms of the green peach aphid. *Acta Entomol. Sin.*, 45 (6): 764 - 769. [张素芳，程家安，杨效文，2002. 棉蚜不同蚜型 DNA 多态性的 RAPD 研究. 昆虫学报，45 (6): 764 - 769]

Zhu D H, Anao Y, Shirota Y, 2001. Studies on the relationships among species in *Oxya* Serville (Orthoptera: Catantopidae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Acta Entomol. Sin.*, 44 (3): 316 - 320. [朱道弘，安藤喜一，城田安幸，2001. 利用 RAPD 对稻蝗属昆虫亲缘关系的研究. 昆虫学报，44 (3): 316 - 320]